

Aus dem Pharmakologischen Institut
der Freien Universität Berlin
Direktor: Professor Dr. med. Hans Herken

Einfluß Na^+ -eliminierender Substanzen
auf den Gehalt an reduziertem
Glutathion in der Rattenniere

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Achim Zesch
aus Leipzig

1968

Aus dem Pharmakologischen Institut
der Freien Universität Berlin
Direktor: Professor Dr. med. Hans Herken

Einfluß Na^+ -eliminierender Substanzen auf den Gehalt an reduziertem Glutathion in der Rattenniere



Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Achim Zesch
aus Leipzig

Dekan: Professor Dr. med. Hans Wolfgang Spier

Referent: Professor Dr. med. Hans Herken

Korreferent: Dr. med. Dr. rer. nat. Heinz Tiedemann



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Freien Universität Berlin

Promoviert am: 6. 11. 1968

Einleitung

Inhaltsverzeichnis

I. Einführung in die chemische Wissenschaft	1
1. Bedeutung der Chemie für die Naturwissenschaften	2
2. Entwicklung der Chemie von der Antike bis zur Neuzeit	3
3. Methoden der Chemie	4
4. Bedeutung der Chemie für die Gesellschaft	5
II. Atomstruktur und Periodensystem	6
1. Aufbau des Atoms	7
2. Periodensystem der Elemente	8
3. Eigenschaften der Elemente	9
4. Bedeutung der Atomstruktur für die Chemie	10
III. Chemische Bindung	11
1. Ionenbindung	12
2. Kovalente Bindung	13
3. Metallische Bindung	14
4. Bedeutung der Bindung für die Eigenschaften der Stoffe	15
IV. Chemische Reaktionen	16
1. Klassifizierung der Reaktionen	17
2. Geschwindigkeit der Reaktionen	18
3. Bedeutung der Reaktionen für die Umwelt	19
V. Physikalische Chemie	20
1. Thermodynamik	21
2. Kinetik	22
3. Elektrochemie	23
4. Bedeutung der Physikalischen Chemie für die Chemie	24
VI. Organische Chemie	25
1. Aufbau der organischen Moleküle	26
2. Nomenklatur der organischen Moleküle	27
3. Eigenschaften der organischen Moleküle	28
4. Bedeutung der Organischen Chemie für die Medizin	29
VII. Anorganische Chemie	30
1. Eigenschaften der anorganischen Moleküle	31
2. Bedeutung der Anorganischen Chemie für die Industrie	32
VIII. Biochemie	33
1. Aufbau der Biomoleküle	34
2. Funktion der Biomoleküle	35
3. Bedeutung der Biochemie für die Medizin	36
IX. Materialchemie	37
1. Eigenschaften der Materialien	38
2. Bedeutung der Materialchemie für die Technik	39
X. Umweltchemie	40
1. Schadstoffe in der Umwelt	41
2. Bedeutung der Umweltchemie für die Politik	42
XI. Nanotechnologie	43
1. Aufbau der Nanomaterialien	44
2. Bedeutung der Nanotechnologie für die Zukunft	45
XII. Schlussfolgerungen	46
1. Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse	47
2. Ausblick auf die Zukunft der Chemie	48
XIII. Literaturverzeichnis	49
XIV. Index	50

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Einleitung	1
Methodik	3
I. Bestimmung der Konzentration von reduziertem Glutathion in der Niere	3
1. Herstellung der Injektionslösungen, Dosierung und Applikation der injizierten Substanzen	3
2. Tiermaterial und Gewinnung der Organe	4
3. Aufarbeitung der Organe	5
a) Reagenzien	
b) Arbeitsgang	
4. Enzymatisch-optische Messung von GSH	6
a) Prinzip der Methode	
b) Reagenzien	
c) Arbeitsgang	
d) Berechnung des GSH-Gehalts der Nieren	
5. Bestimmung des Wassergehalts der Nieren	8a
a) Ausführung	
b) Berechnung	
II. Untersuchungen über den Einfluß von Furosemid auf die Kinetik der Glutathion-Reduktase	9
1. Prinzip der Messung	9
2. Reagenzien	10
3. Ausführung der Messung	11
4. Auswertung und Berechnung	11
III. Infusionsversuche	12
1. Beschreibung der Versuchsanordnung	13
2. Ausführung der Infusionsversuche	13
3. Flammenphotometrische Bestimmung der Na^+ -Konzentration im Urin	14
4. Fluorometrische Mikrobestimmung von Furosemid im Harn	14
a) Prinzip der Methode	
b) Ausführung	
IV. Statistische Auswertung	15

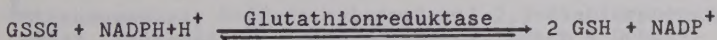
	Seite
Ergebnisse	17
I. Veränderungen der GSH-Konzentration der Niere nach Gabe von 6-Aminonikotinsäureamid	17
II. Der Einfluß von Vasopressin und Aldosteron auf die GSH-Konzentration der Niere	17
III. Der Einfluß von Triamteren und Amilorid auf die GSH-Konzentration der Niere	20
IV. Der Einfluß von Ethacrynsäure auf die GSH-Konzentration der Niere	22
V. Der Einfluß von Furosemid auf die GSH-Konzentration in der Niere	23
VI. Beziehungen zwischen natriumeliminierendem Effekt, Ausscheidung des Diuretikums und Abnahme der GSH-Konzentration in der Niere nach Gabe von Furosemid	26
VII. Der Einfluß von Furosemid auf die Aktivität der Glutathionreduktase	29
VIII. Der Einfluß einer kombinierten Behandlung von 6-Aminonikotinsäureamid und Furosemid auf die renale Na^+ -Elimination und die Erniedrigung der GSH-Konzentration in der Niere	32
IX. Die Einschränkung der natriumeliminierenden Wirkung von Furosemid durch Injektion von GSH	35
Diskussion	37
Zusammenfassung	40
Literaturverzeichnis	42

Einleitung

Die Applikation von 6-Aminonikotinsäureamid (6-AN) bewirkt eine Reihe von Stoffwechselstörungen. Hierzu gehört u.a. eine Einschränkung des tubulären Na^+ -Transports, die sich in einer vermehrten renalen Elimination von Natriumionen äußert (ZEMISCH, 1964; HERKEN, SENFT und ZEMISCH, 1964; SENFT, LOSERT, SITT, McEVOY und KAESS, 1966).

Untersuchungen über den Mechanismus der durch 6-AN verursachten Störungen haben ergeben, daß dieses Derivat der Nikotinsäure in die natürlichen Pyridinnukleotide [Nikotinsäureamid-adenin-dinukleotid(phosphat) = NAD(P)] unter Bildung von 6-Aminonikotinamid-adenin-dinucleotid(phosphat) (6-ANAD, 6-ANADP) eingebaut wird. Diese Biosynthese abnorm strukturierter Pyridinnukleotide beruht auf der mangelnden Spezifität einer Nukleosidase [NAD(P) glycohydrolase EC 3.2.2.6], die NAD^+ und NADP^+ zwischen dem N-Atom des Pyridinringes und der Ribose spaltet und das freigesetzte Nikotinsäureamid gegen 6-AN austauscht (JOHNSON und McCOLL, 1955; DIETRICH, FRIEDLAND und KAPLAN, 1958). HERKEN und NEUHOFF (1964) haben den Einbau von 6-AN in die Pyridinnukleotide der Niere quantitativ gemessen und gefunden, daß in diesem Organ nach Gabe des Antimetaboliten bis zu 70 % des NADP in 6-ANADP umgewandelt werden.

Bei der Prüfung der Folgen einer 6-ANAD- bzw. 6-ANADP-Bildung wurde festgestellt, daß diese NAD - und NADP -Analoge als Coenzyme der wasserstoffübertragenden Fermente unwirksam sind (DIETRICH, FRIEDLAND und KAPLAN, 1958; COPER und HERKEN, 1963, s. dort weitere Literatur; BRUNNEMANN, COPER und NEUBERT, 1964). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, daß 6-ANADP die Funktion des noch vorhandenen NADP als Coferment von Dehydrogenasen hemmt (COPER und NEUBERT, 1964). Diese Wirkung läßt sich besonders deutlich am Beispiel der Glutathionreduktase (NADPH_2 : glutathione oxidoreductase EC 1.6.4.2.) zeigen, einem Enzym, das die Umwandlung von oxydiertem Glutathion (GSSG) in die reduzierte Form des Peptids (GSH) beschleunigt. Es katalysiert folgende Reaktion:



Die genannten Autoren haben bei in vitro durchgeführten Versuchen gefunden, daß 40 % weniger Glutathion reduziert werden, wenn die Konzentration des 6-ANADP die des $\text{NADPH} + \text{H}^+$ um das Fünffache übersteigt.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob die Biosynthese dieses abnorm strukturierten Pyridinnukleotids auch in vivo zu einer Störung des Wasserstofftransports führt und eine Abnahme der renalen GSH-Konzentration hervorruft. Außerdem wurde geprüft, ob zwischen tubulärem Na^+ -Transport und der enzymatischen Übertragung von Wasserstoff eine Beziehung erkennbar ist. HERKEN, SENFT und ZEMISCH (1964) haben nämlich gefunden, daß nach Gabe von 6-AN der Einbau des Antimetaboliten in die natürlichen Coenzyme der Dehydrogenasen zum Zeitpunkt der maximalen Mehrausscheidung von Natriumionen sein größtes Ausmaß erreicht.

Daran anschließend wurde untersucht, ob auch andere Substanzen, die den tubulären Na^+ -Transport und damit die renale Ausscheidung von Natriumionen beeinflussen, zu einer Hemmung der enzymatischen Wasserstoffübertragung führen, die sich in einer Abnahme der GSH-Konzentration äußert.

Methodik

I. Bestimmung der Konzentration von reduziertem und oxydiertem Glutathion in der Niere

1. Herstellung der Injektionslösungen, Dosierung und Applikation der injizierten Substanzen¹

a) 6-AN:

50 mg 6-AN(6-Aminonikotinsäureamid, Reinsubstanz) wurden in 10 ml physiologischer Kochsalzlösung unter leichter Erwärmung gelöst. Die Lösung wurde in einer Dosis von 50 mg/kg intraperitoneal injiziert. Die Kontrolltiere erhielten Kochsalzlösung.

b) Furosemid:

10,20 oder 40 mg Furosemid² (Reinsubstanz) wurden in 1 ml 0,2 n NaOH gelöst und mit 17 ml Aqua dest. verdünnt. Die Wasserstoffionenkonzentration der Lösung wurde durch Zugabe von 0,1 n HCl auf pH 7,0 eingestellt. Zur Erreichung der Isotonie wurde eine entsprechende Menge NaCl oder Glucose (bei den Infusionsversuchen) zugesetzt, anschließend wurde die Lösung mit Aqua dest. ad 20 ml aufgefüllt.

Zur Bestimmung der Na⁺-eliminierenden Wirkung des Diuretikums wurden den Tieren 5,10 oder 20 mg/kg i.v. injiziert. Die Messung des renalen GSH-Gehalts erfolgte zu verschiedenen Zeiten nach i.v. Injektion von 5 mg/Furosemid.

c) Ethacrynsäure³ wurde in einer Dosis von 5 mg/kg i.v. injiziert. Hierzu wurde der Inhalt einer Trockenampulle des Handelspräparates Lyovac-Edecrin^R (Merck, Sharp & Dohme), die 50 mg der Reinsubstanz mit einem Lösungsvermittler enthält, in 5 ml Aqua dest. gelöst. Diese Lösung wurde 1:10 mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt. Kontrollen er-

¹Ich danke den genannten Firmen für die freundliche Überlassung der Substanzen.

²Furosemid, 4-Chlor-N-(2-furylmethyl)-5-sulfamylanthranilsäure, Lasix^R (Farbwerke Hoechst)

³Ethacrynsäure, 4-(2-Aethylacryloyl)-2,3-dichlorphenoxyessigsäure, Hydromedin^R, Edecrin^R (Merck, Sharp & Dohme)

hielten eine Injektion mit einer entsprechenden Verdünnung des Lösungsvermittlers.

- d) Amilorid(hydrochlorid)¹ wurde in einer Dosis von 1 mg/kg intravenös injiziert. Hierzu wurde 1 mg Reinsubstanz in 10 ml 0,9 %iger NaCl-Lösung gelöst. Kontrollen erhielten physiologische Kochsalzlösung.
- e) Triamteren² wurde den Tieren in einer Gummi arabicum-Suspension durch eine Schlundsonde oral verabfolgt. Die Dosierung betrug 5 mg/kg, in einigen Versuchen auch 2 mg/Tier und Stunde. Kontrollen erhielten eine Gummi arabicum-Suspension ohne den Wirkstoff.
- f) Zur Messung der GSH-Konzentration der Niere unter dem Einfluß von Vasopressin wurde den Ratten das Hormon in einer Dosis von 5 mE/Tier subcutan injiziert. Hierzu wurde eine Ampulle Tonephin^R (Farbwerke Hoechst) 1:1000 mit physiologischer NaCl-Lösung verdünnt. Kontrollen erhielten nur Kochsalzlösung (0,9 %).
- g) Der Einfluß von Aldosteron auf den GSH-Gehalt der Nieren wurde an adrenaletomierten Tieren untersucht. Die Nebennieren wurden vier Tage vor dem Versuch in Äthernarkose entfernt. Als Trinkflüssigkeit erhielten die Ratten nach der Operation 0,9 %ige Kochsalzlösung. Aldosteron wurde ihnen in einer Dosis von 7,5 µg/Tier i.p. injiziert. Die Injektionslösung wurde durch entsprechende Verdünnung einer Ampulle (500 µg/ml) Aldocorten^R (Ciba AG) mit 0,9 %iger NaCl-Lösung hergestellt. Adrenaletomierten Kontrolltieren wurde physiologische Kochsalzlösung injiziert.

2. Tiermaterial und Gewinnung der Organe

Als Versuchstiere dienten männliche Wistarratten mit einem Körpergewicht zwischen 130 und 160 g. Die Tiere wurden bei einer Raumtemperatur von 28 °C gehalten und erhielten Altromin

¹Amiloridhydrochlorid, N-Amidin-3,5-diamino-6-chlorpyrazin-carboxamid-hydrochlorid-dihydrat, MK 870 (Merck, Sharp & Dohme)

²Triamteren, 2,4,7-Triamino-6-phenylpteridin, Jatropur^R

R-Trockenfutter der Firma Altrogge, sowie Leitungswasser. Zu Beginn der Experimente wurde den Tieren Nahrung und Trinkflüssigkeit entzogen.

Nach Dekapitation der Ratten wurden die Nieren möglichst schnell entnommen, von dem sie umgebenden Fettgewebe und der bindegewebigen Kapsel befreit und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Aufbewahrung erfolgte bei -20°C unter einer N_2 -Atmosphäre in verschlossenen Gläsern. Spätestens nach 20 Std. wurden die Organe aufgearbeitet.

3. Aufarbeitung der Organe

a) Reagenzien

1. Perchlorsäure 6 % w/w
2. Kaliumcarbonatlösung 1,0 M

b) Arbeitsgang

Beide Nieren wurden in gefrorenem Zustand auf einer Torsionswaage (Fa. Sauter) gewogen und anschließend sofort in 6 ml kalter Perchlorsäure unter Eiswasserkühlung vollständig homogenisiert (Teflon-Glashomogenisator: Potter-Elvehjem). Das Homogenat wurde bei -2°C und 20 000 g 20 min. lang zentrifugiert. 3 ml des klaren Überstandes wurden in ein kleines 10 ml fassendes braunes Glas pipettiert, das in einem Eisbad stand. Anschließend erfolgte die Neutralisation des Extraktes durch Zugabe von 1,1 ml K_2CO_3 -Lösung. Nach vorsichtigem Schütteln wurde das Gefäß mit Parafilm (Fa. Marathon, USA) luftdicht verschlossen, so daß das entstandene Kohlendioxyd nicht entweichen konnte. Dies hatte zur Folge, daß sich im Gefäß über der Flüssigkeit größtenteils eine CO_2 -Atmosphäre befand.

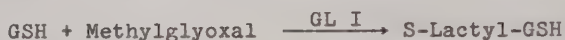
Diese Maßnahme sowie das Einfrieren der Nieren in flüssigem N_2 diente zur Verhinderung der Oxydation von GSH durch Luftsauerstoff. Die Gefäße wurden im Eisbad bis zum vollständigen Absetzen des gebildeten Kaliumperchloratniederschlages (wenigstens 30 min. lang) aufbewahrt.

4. Enzymatisch-optische Messung von reduziertem Glutathion (GSH)

Die Messung erfolgte nach dem von BERGMEIER (1962) angegebenen Verfahren.

a) Prinzip der Methode

Reduziertes Glutathion wird durch Glyoxalase I (S-lactoyl-glutathione methylglyoxal-lyase(isomerizing) EC 4.4.1.5) mit Methylglyoxal (Pyruvaldehyd) quantitativ in S-Lactyl-Glutathion übergeführt:



Die Konzentration des gebildeten S-Lactyl-GSH kann mit Hilfe eines Absorptionsspektrophotometers quantitativ gemessen werden.

S-Lactyl-GSH hat ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 240 mμ. Als Spektrophotometer diente ein Gerät der Fa. Beckman (Modell DU).

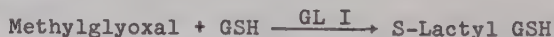
b) Reagenzien

1. Phosphatpuffer 0,1 M; pH = 6,8

613 mg KH_2PO_4 p.a. und 955 mg K_2HPO_4 werden in 100 ml Aqua dest. gelöst.

2. Methylglyoxallösung ca. 0,1 M

Eine gekaufte technische Methylglyoxallösung (24 - 37 %) wurde mit Wasserdampf destilliert. Im unverdünnten Destillat und in 1:10 und 1:100 mit Aqua dest. hergestellten Verdünnungen wurde der Methylglyoxalgehalt enzymatisch-optisch nach der Gleichung:



bestimmt. Der Gehalt an Methylglyoxal im Destillat war 0,6 M. Für die Glutathion-Bestimmung wird eine 0,1 M Lösung benötigt. Dafür wurde das Destillat 1:6 mit Aqua dest. verdünnt.

3. Eieralbuminlösung (ca. 1 %)

0,5 g Ovalbumin wurden in 50 ml Aqua dest. gelöst und filtriert. Vor jedem Versuch wurde die Lösung frisch hergestellt.

4. Glyoxalase I: 1 mg Protein/ml, gelöst in Glycerin (Präparat der Fa. Boehringer & Soehne, Mannheim)

c) Arbeitsgang

Von dem klaren, enteiweißten und neutralisierten Überstand des Homogenats wurden mit einer Mikropipette (Modell "Marburg" der Firma Netheler & Hinz, Hamburg-Eppendorf) zweimal 0,5 ml entnommen und in zwei vorher mit conc. Salpetersäure, Wasser und Aqua dest. gereinigte Quarzküvetten von 1 cm Schichtdicke pipettiert. Eine Küvette diente als Leerwert, die andere als Meßwert. In beide Küvetten wurden nun nacheinander folgende Reagenzien gegeben:

1. Meßwert: 2,2 ml Phosphatpuffer
0,2 ml Eieralbuminlösung
0,005 ml Glyoxalase I
2. Leerwert: 2,5 ml Phosphatpuffer
0,2 ml Eieralbuminlösung

Der Küvetteninhalt wurde mit einem Kunststoffstab gut vermisch. Zur GSH-Bestimmung wurde nun bei einer Wellenlänge von 240 m μ die Extinktion E_1 gemessen.

Dann wurden 0,02 ml Methylglyoxallösung zugegeben, gut gemischt und nach 15 min. die Extinktion E_2 abgelesen. Eine erneute Zugabe von 0,02 ml Methylglyoxallösung ergab nach weiteren 5 min. den Extinktionswert E_3 , der zur Ermittlung der Eigenextinktionsveränderung von Methylglyoxal dient.

Da der Küvettenhalter Platz für vier Küvetten bietet, können an dem Gerät jeweils drei Werte in einem Arbeitsgang gemessen werden. Die Reihenfolge wurde so gewählt, daß jede 2. Messung einem Kontrolltier entsprach.

d) Berechnung des GSH-Gehalts der Nieren

Die Absorptionszunahme von 0,02 ml Methylglyoxallösung (ΔE_{MG}) errechnet man durch Subtraktion der Extinktion E_2 vom Wert E_3 :

$$E_3 - E_2 = \Delta E_{MG}.$$

Die Extinktionsdifferenz $E_1 - E_2 - \Delta E_{MG} = \Delta E_{GSH}$ ist auf das im Ansatz vorhandene GSH zurückzuführen, das in S-Lactyl-GSH übergeführt wurde. Der Wert ΔE_{GSH} geht in die Berechnung ein.

Nach RACKER (1951) hat S-Lactyl-GSH bei einer Wellenlänge von 240 mμ einen molaren Extinktionskoeffizienten ϵ_{240} von $3,37 \cdot 10^6 \cdot \frac{\text{cm}^2}{\text{mol}}$. Dies bedeutet, daß die Zunahme der Absorption um $\Delta E = 1$ in einer Küvette von 1 cm Schichtdicke einer GSH-Konzentration von $\frac{1}{3,37} = 0,297 \mu\text{mol}$ entspricht. Der GSH-Gehalt der Nieren in $\mu\text{mol/g}$ Feuchtgewicht ergibt sich aus folgenden Größen:

$\Delta E_{\text{GSH}} \cdot 0,297$: GSH-Gehalt der Küvette in μmol

KV : Küvettenendvolumen (2,925 ml)

HV : Homogenisationsvolumen (6 ml Perchlorsäure + Wassergehalt der Nieren. Hierfür wurden 77 % des Gewichts der gefrorenen Organe eingesetzt. Dieser Mittelwert war in Vorversuchen ermittelt worden.)

NV : Volumen des neutralisierten Extraktes (3 ml Überstand des zentrifugierten Homogenats + 1,1 ml K_2CO_3 -Lösung = 4,1 ml)

FG : Feuchtgewicht der Nieren in g

Hieraus wird die GSH-Konzentration in $\mu\text{mol/g}$ Feuchtgewicht nach folgender Formel ermittelt:

$$\begin{aligned} \text{mol/g FG} &= \frac{\Delta E}{\text{GSH}} \cdot \frac{0,297 \cdot \text{KV} \cdot \text{HV} \cdot \text{NV}}{0,5 \cdot 3 \cdot \text{NG}} \\ &= \frac{0,297 \cdot 2,925 \cdot 4,1}{0,5 \cdot 3} \cdot \frac{\Delta E}{\text{GSH}} \cdot \frac{\text{HV}}{\text{NG}} \\ &= 2,375 \cdot \frac{\Delta E}{\text{GSH}} \cdot \frac{\text{HV}}{\text{NG}} \end{aligned}$$

e) Prüfung der Ausbeute

Zur Prüfung der Frage, ob die verwendete Methode das gesamte im Gewebe enthaltene GSH erfaßt, wurde eine $0,4 \cdot 10^{-3}$ M GSH-Lösung hergestellt. Hierzu wurden 12,29 mg GSH in 100 ml Aqua dest. gelöst. Die Messung des GSH-Gehalts dieser Lösung mit der angegebenen enzymatisch-optischen Methode ergab eine Konzentration von $0,395 \cdot 10^{-3}$ M, d.h. es wurden 98,8 % des eingewogenen reduzierten Glutathions wiedergefunden.

Auch bei Zugabe von $1 \mu\text{mol}$ GSH (2,5 ml dieser Lösung) zu einer Gewebprobe wurden nach Durchführung des gesamten zur Extraktion und Messung erforderlichen Arbeitsganges 95 % des eingesetzten Glutathions nachgewiesen.

5. Bestimmung des Wassergehalts der Nieren

a) Ausführung

Sofort nach der Dekapitation der Tiere wurden die Nieren entnommen und das Fettgewebe sowie die bindegewebige Kapsel entfernt. Die Organe wurden anschließend in 1 cm hohe und 2 cm breite bis zur Gewichtskonstanz ausgewogene Gläser gegeben und auf einer analytischen Waage (Fa. Mettler) gewogen. Um den durch Verdunstung von Gewebwasser auftretenden Fehler möglichst gering zu halten, wurde die Zeit von der Nierenentnahme bis zum Ablesen des Gewichts auf genau 1 min. festgelegt.

Die Gläser mit den Organen wurden 2 Tage lang bei 105°C in einem Trockenschrank aufbewahrt. Während dieser Zeit trocknen sie bis zur Gewichtskonstanz. Zum Abkühlen wurden die Gefäße 4 Std. über Silicagel aufbewahrt. Danach erfolgte die Auswaage auf der analytischen Waage.

b) Berechnung

Der Wassergehalt der Nieren in Prozent des Frischgewichtes errechnet sich wie folgt:

1. Feuchtgewicht (FG) - Tara (g)
(—) Trockengewicht (Trg) - Tara (g)
Wassergehalt (WG)
2. $\frac{WG \cdot 100}{FG} = WG \text{ (in \% des Frischgewichts)}$

II. Untersuchungen über den Einfluß von Furosemid auf die Kinetik der Glutathion-Reduktase

Die Messung wurde mit einem automatisch registrierenden Spektralphotometer (Typ Beckman DK 2) durchgeführt. Das Gerät erlaubt eine graphische Darstellung von Extinktionsänderungen in Abhängigkeit von der Zeit.

1. Prinzip der Messung

Glutathion-Reduktase (GR) [NADPH₂: glutathione oxidoreductase EC 1.6.4.2.] katalysiert die Reduktion von oxydiertem Glutathion (GSSG) zur reduzierten Form des Tripeptids (GSH).

Als Wasserstoffdonator dient NADPH₂



Das Ferment erreicht seine höchste Aktivität bei einem pH-Wert von 6,8 und einer Temperatur von 20 °C (BERGMEIER, 1962). Die angegebene Reaktion läuft unter diesen Bedingungen nahezu quantitativ von links nach rechts ab. Diese Umsetzung kann als Extinktionsabnahme bei einer Wellenlänge von 340 mμ fortlaufend auf einem graduierten Papier registriert werden.

Bei einer Konzentration von 10⁻³ M GSSG und 4 · 10⁻⁴ M NADPH₂ erfolgt die Reduktion des Glutathions mit maximaler Geschwin-

digkeit. Bei Sättigung mit GSSG beträgt die Michaeliskonstante $K_{\text{NADPH}_2} = 2,5 \cdot 10^{-5}$ M. Bei Sättigung mit NADPH_2 beträgt sie für GSSG $K_{\text{GSSG}} = 7 \cdot 10^{-5}$ M. Das Ferment wird bei einer GSSG-Konzentration von mehr als $5 \cdot 10^{-3}$ gehemmt (Substrathemmung) (BERG-MEIER, 1962).

2. Reagenzien

a) GSSG-Lösung (10^{-1} M)

306 mg GSSG (Reinsubstanz, Fa. Boehringer & Soehne, Mannheim) wurden in 5 ml Phosphatpuffer (pH 6,8) gelöst. Davon wurde je eine Verdünnung 1:1, 1:5 und 1:10 hergestellt. Somit enthielten 0,02 ml jeder Lösung:

Originallösung	= 2 μmol GSSG
1:1-Verdünnung	= 1 μmol GSSG
1:5-Verdünnung	= 0,4 μmol GSSG
1:10-Verdünnung	= 0,2 μmol GSSG

b) NADPH_2 -Lösung ($4,8 \cdot 10^{-3}$ M)

4 mg NADPH_2 -Reinsubstanz wurden in 1 ml NaHCO_3 -Lösung (5 %) gelöst. Diese Lösung wurde bei Messungen mit variabler NADPH_2 -Zugabe 1:1 verdünnt.

c) Glutathionreduktase (20 μg Protein/ml)

20 μl der Fermentkristallsuspension (Fa. Boehringer & Soehne, Mannheim), 1 mg Protein/ml) wurden mit 1 ml Phosphatpuffer, dem 5 mg Rinderserumalbumin "reinst" (Behring-Werke, Marburg) zugesetzt worden waren, verdünnt. Dieser Ansatz war ca. 3 - 4 Std. im Eisbad haltbar.

d) Phosphatpuffer (pH 6,8; 0,1 M)

Herstellung wie auf Seite 6 beschrieben.

e) Phosphatpuffer (0,1 M; pH 6,8) mit einem Zusatz von Furosemid folgender Konzentrationen: $0,7 \cdot 10^{-3}$ M; $1,0 \cdot 10^{-3}$ M; $1,3 \cdot 10^{-3}$ M.

Furosemid hat ein Molekulargewicht von 330,759.

Zur Herstellung der angegebenen Lösungen wurden 23,2; 33,1 und 43,0 mg der Substanz in je 100 ml Phosphatpuffer (d) gelöst.

3. Ausführung der Messung

Bei Messung mit variabler GSSG-Konzentration enthielt die Küvette:

2,5 ml Phosphatpuffer (ohne oder mit den verschiedenen Furosemidkonzentrationen)

0,01 ml Glutathionreduktase

0,05 ml NADPH₂-Lösung (4 mg/ml),

bei Messung mit variabler NADPH₂-Zugabe:

2,5 ml Puffer (s. oben)

0,01 ml Glutathionreduktase

0,01, 0,02 oder 0,03 ml NADPH₂-Lösung (2 mg/ml)

Nach einem kurzen Vorlauf wurde die Reaktion durch Zugabe von 0,02 ml GSSG-Lösung gestartet. Bei Messung der Enzymkinetik mit variabler GSSG-Konzentration wurden jeweils 0,02 ml der oben genannten Verdünnungen der GSSG-Stammlösung hinzupipettiert, umgerührt und die Zeit markiert. Die Abnahme der NADPH₂-Konzentration wurde über einen Zeitraum von 10 min. beobachtet.

Bei Untersuchungen mit variablen NADPH₂-Konzentrationen wurde jede Reaktion mit 0,05 ml GSSG-Stammlösung gestartet. In der Gegenküvette befand sich jeweils eine Lösung, die außer GSSG die gleichen Bestandteile wie die Meßküvette enthielt.

4. Auswertung und Berechnung

Auf der von dem automatisch registrierenden Spektrophotometer aufgezeichneten Kurve wurde die Extinktionsabnahme während der ersten 5 min. nach dem Start der Reaktion mit GSSG ermittelt. Die Graduierung des Papierees erlaubt eine Genauigkeit der Ablesung von $\Delta E = 0,05$. Unter Berücksichtigung des molaren Extinktionskoeffizienten von NADPH₂ ($\epsilon_{340} = 6,22 \cdot 10^6 \cdot \frac{\text{cm}^2}{\text{mol}}$, d.h. 0,161 μmol GSSG/Küvette; s. auch Seite 8), des Küvettenvolumens (KV), der Reaktionszeit (t) und des Extinktionsabfalles ΔE läßt sich die Aktivität (v) des Ferments in der Dimension $\mu\text{mol}/\text{min.}$ nach folgender Formel berechnen:

$$\begin{aligned} v &= \frac{0,161 \cdot \Delta E \cdot KV}{t} \\ &= \frac{0,161}{5} \cdot KV \cdot \Delta E \\ &= 0,0322 \cdot KV \cdot \Delta E \end{aligned}$$

Die Abhängigkeit der Umsatzgeschwindigkeit v von der Substratkonzentration S wurde nach dem Verfahren von LINEWEAVER-BURK (1934) ermittelt. Hierbei wird der reziproke Wert von v ($\frac{1}{v}$) auf die Ordinate, derjenige von S ($\frac{1}{S}$) auf die Abszisse eines Koordinatensystems aufgetragen. Die Substratkonzentration wurde aus der Menge des zugegebenen GSSG bzw. NADPH_2 und dem Küvettenvolumen berechnet.

Bei Verbindung der auf diese Weise erhaltenen Punkte ergibt sich eine Gerade, deren Winkel mit der Abszisse ein Maß für die Fermentaktivität ist. Dieser Winkel nimmt zu, wenn das Enzym gehemmt ist.

In einer anderen Art der Darstellung wurde der Quotient zwischen Substratkonzentration und Umsatzgeschwindigkeit $\frac{S}{v}$ (Ordinate) gegenüber der Substratkonzentration S (Abszisse) aufgetragen. Dieses Verfahren erlaubt eine genauere Differenzierung zwischen einem kompetitiven und nicht kompetitiven Hemmtyp als die von LINEWEAVER und BURK angegebene Methode (WEBB, 1963). Bei nicht kompetitiver Hemmung schneiden sich die bei verschiedener Hemmstoffkonzentration ermittelten Kurven auf der Abszisse; bei kompetitiver Hemmung verlaufen sie parallel zueinander.

In einer dritten Art der Darstellung wurde $\frac{1}{v}$ auf der Ordinate gegen die Hemmstoffkonzentration I auf der Abszisse aufgetragen. Ist die enzymatische Reaktion nicht gehemmt, so bildet die Verbindung der einzelnen Punkte eine Gerade, die parallel zur Abszisse verläuft (WEBB, 1963).

III. Infusionsversuche

Zur Prüfung der Ausscheidung von Natriumionen unter dem Einfluß von 6-AN und Furosemid wurden an Ratten Infusionsversuche durchgeführt. Bei den mit dem Diuretikum durchgeführten Experimenten wurde auch die Elimination des Anthranilsäurederivats gemessen.

1. Beschreibung der Versuchsanordnung

Der Aufbau des Geräts und die Durchführung dieser Methode wurden von HERKEN, SENFT, SCHWARZ und MERKER (1963) angegeben. Die Tiere werden dabei in Einzelkäfige aus Plexiglas gesetzt. Die Käfige sind so konstruiert, daß eine getrennte Harn- und Stuhlsammlung möglich ist. Der Urin wird in Glastrichtern aufgefangen und durch angesetzte Glasröhren in graduierte Zylinder geleitet, die eine Bestimmung der ausgeschiedenen Volumina erlauben.

Jeweils 5 Einzelkäfige befinden sich in einer temperatur- und feuchtigkeitskonstanten Plexiglaskammer, um die extrarenalen Wasserverluste konstant zu halten. Der Schwanz des Tieres befindet sich außerhalb des Einzelkäfigs und ist außen am Käfig an der Schwanzwurzel mit Heftpflaster fixiert.

In eine Schwanzvene wird zur intravenösen Infusion eine Kanüle geschoben, an die ein PVC-Schlauch angeschmolzen ist. Über ein Ventil ist dieser Schlauch mit dem Infusionsapparat verbunden. Die Infusionslösung befindet sich in einem zwei Liter fassenden Gefäß und gelangt durch eine Schlauchpumpe in die PVC-Schläuche. Die Infusionsgeschwindigkeit betrug bei den durchgeführten Versuchen 5 ml/Tier und Stunde. Die isotone Infusionslösung enthielt 0,2 % NaCl und 4,3 % Glucose.

2. Ausführung der Infusionsversuche

Drei Stunden lang, bevor die Ratten die zu untersuchenden Substanzen intraperitoneal (6-AN) oder i.v. (Furosemid) injiziert bekamen, erhielten die Tiere eine intravenöse Dauerinfusion mit der isotonen Glucose-Kochsalz-Lösung. Zum Zeitpunkt der Injektion von 6-AN oder Furosemid entspricht die Na^+ - und Wasserausscheidung der infundierten Na^+ - und Flüssigkeitsmenge (steady state).

Die nach Gabe von 6-AN ausgeschiedenen Harnmengen wurden stündlich abgenommen und zur Messung der Na^+ -Konzentration aufbewahrt. Der Versuch erstreckte sich über 8 Stunden.

Erhielten die Ratten Furosemid, so wurden die ausgeschiedenen Harnportionen nach 7,5, 15, 30, 45, 60, 90 und 120 min. gesammelt. Außer dem Na^+ -Gehalt wurde darin auch die Konzentration des Diuretikums bestimmt.

3. Flammenphotometrische Bestimmung der Na^+ -Konzentration im Urin

Die Messung der Na^+ -Konzentration wurde mit einem Gerät der Firma Beckman, Modell DU, durchgeführt.

Für die Untersuchung wurde der Urin im Verhältnis 1:100 mit Aqua dest. verdünnt. Zur Bestimmung der Na^+ -Konzentration wurde eine Eichreihe hergestellt. Für einen Konzentrationsbereich von 0 bis 5 $\mu\text{val Na}^+/\text{ml}$ wurden bei einer Wellenlänge von 589 m μ die Transmissionswerte gemessen und daraus eine Eichkurve gezeichnet.

Der Eichlösung wurden 0,4 $\mu\text{val K}^+/\text{ml}$ zugesetzt, um ein ähnliches Verhältnis von Na^+ und K^+ wie im 1:100 verdünnten Urin zu erreichen.

Der am Gerät abgelesene Transmissionswert für jede Probe ergibt an Hand der Eichkurve die Na^+ -Konzentration in $\mu\text{val/ml}$ der vorgelegten Lösung. Die in einem bestimmten Zeitraum ausgeschiedene Menge an Natriumionen erhält man durch Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor 100 und der in diesem Zeitraum ausgeschiedenen Harnmenge.

4. Fluorometrische Mikrobestimmung von Furosemid im Harn

a) Prinzip der Methode

Die Messung wurde mit einem Spektralphotofluorometer der Fa. Aminco-Bowman durchgeführt, das mit zwei Monochromatoren ausgestattet ist. Furosemid zeigt bei fluorometrischer Untersuchung drei Aktivierungsmaxima bei Wellenlängen von $\lambda = 240, 275$ und 350 m μ . Wird die Substanz in salzsaurer Lösung bei $\lambda = 350$ m μ aktiviert, so kann eine Fluoreszenz mit einem Maximum bei einer Wellenlänge von 430 m μ gemessen werden.

Diese Eigenschaft der Verbindung ermöglicht eine quantitative Mikrobestimmung. Nach HAJDU und HÄUSLER (1964) erfaßt man bei der Bestimmung von Furosemid auf fluorometrischem Wege hauptsächlich die unveränderte Substanz, da der im Organismus durch Abspaltung des Furanringes entstehende Metabolit 4-Chlor-5-sulfamylantranilsäure bei den verwendeten Wellenlängen nur eine geringe Fluoreszenz zeigt.

b) Ausführung

Zur Messung des Furosemidgehalts in den gesammelten Harnproben wurden jeweils 0,1 ml Urin mit 5 ml 0,01 n HCl, d.h. im Verhältnis 1:51 verdünnt.

Die Konzentration des Anthranilsäurederivats wurde durch Vergleich mit der Transmission einer Furosemideichlösung ermittelt. Zur Herstellung der Eichlösung wurden 10 mg Furosemid in 1 ml 0,1 n Natronlauge gelöst, mit vierfach destilliertem Wasser verdünnt und nach Zugabe von 1 ml 0,1 n HCl ad 100 ml mit vierfach destilliertem Wasser aufgefüllt. Diese Stammlösung, die 100 µg/ml Furosemid enthielt, wurde mit 0,01 n HCl auf Konzentrationen von 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 und 1 µg/ml verdünnt. Die Transmissionen dieser Eichwerte, sowie eines Leerwertes ohne Furosemid, wurden am Spektralphotofluorometer gemessen. Bei den verwendeten Konzentrationen gilt das Lambert-Beersche Gesetz. Das bedeutet, daß die Beziehung zwischen der Furosemidkonzentration und der jeweiligen Transmission linear ist, so daß die Eichkurve eine Gerade ergibt. Von dieser Kurve können die Furosemidkonzentrationen der untersuchten Verdünnungen abgelesen werden.

Die im Harn ausgeschiedene Menge des Diuretikums ergibt sich durch Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor 51 und dem jeweiligen Urinvolumen.

Auch andere Bestandteile des Urins zeigen eine geringe Fluoreszenz. Es wurde deshalb neben den Meßwerten ein Leerwert am Spektralphotofluorometer untersucht, der Harn eines Tieres enthielt, das kein Furosemid erhalten hatte. Dieser Leerwert wurde bei der Berechnung der Furosemidausscheidung berücksichtigt.

IV. Statistische Auswertung

Die Ergebnisse wurden in den Tabellen und Abbildungen als Mittelwerte ($m = \frac{\sum x}{n}$) angegeben. Daneben wurden die mittleren Fehler der Mittelwerte (ϵ) eingetragen. Der mittlere Fehler des Mittelwertes (Absolutfehler) ergibt sich aus der Formel:

$$\epsilon = \frac{\sum x^2 - m \sum x}{n(n-1)}$$

Der mittlere Fehler einer Summe oder Differenz zweier Mittelwerte (ϵ_{Δ}) wird auf folgende Weise errechnet:

$$\epsilon_{\Delta} = \sqrt{\epsilon_1^2 + \epsilon_2^2}.$$

Hierbei bedeutet:

Σx = Summe der Einzelwerte

Σx^2 = Summe der Quadrate der Einzelwerte

n = Anzahl der Einzelwerte

Ob sich die Mittelwerte einzelner Gruppen (m_1 und m_2) signifikant unterscheiden, wurde mit Hilfe des t-Tests geprüft:

$$t = \frac{m_1 - m_2}{\sqrt{\epsilon_1^2 + \epsilon_2^2}}.$$

Mit Hilfe der t-Tafeln von PÄTAU (1943) erhält man unter Berücksichtigung des Freiheitsgrades:

$$F = n_1 + n_2 - 2 \quad (\text{vorausgesetzt: } n_1 \sim n_2)$$

die Wahrscheinlichkeit des Unterschiedes (p). Signifikante Unterschiede zwischen zwei Mittelwerten bestehen, wenn sich die Gaußschen Verteilungskurven um weniger als 5 % überschneiden, d.h. der dafür charakteristische Wert $p < 0,05$ ist.

Ergebnisse

I. Veränderungen der GSH-Konzentration der Niere nach Gabe von 6-Aminonicotinsäureamid

Erhalten Ratten 50 mg/kg 6-AN, so nimmt die Konzentration an reduziertem Glutathion in der Niere kontinuierlich ab. 6 Stunden nach intraperitonealer Injektion der Substanz werden nur noch 62 % des bei unbehandelten Tieren gemessenen Wertes gefunden. Danach steigt der GSH-Gehalt wieder an, 16 Stunden nach Gabe des Antimetaboliten hat er fast 80 % des Kontrollwertes erreicht (Tab. 1).

Ein Vergleich zwischen dem natriumeliminierenden Effekt des 6-AN und der Erniedrigung der GSH-Konzentration in der Niere nach Gabe der Verbindung zeigt, daß eine zeitliche Übereinstimmung zwischen der Höhe der Na^+ -Mehrausscheidung und der Abnahme des renalen GSH-Gehalts besteht. Das Maximum der tubulären Störung des Na^+ -Transports tritt zu dem gleichen Zeitpunkt auf, in dem die GSH-Konzentration am stärksten erniedrigt ist (Abb. 1).

II. Der Einfluß von Vasopressin und Aldosteron auf die GSH-Konzentration der Niere

Untersuchungen von MOLINA, FARAH und KRUSE (1963) sowie FARAH (1964) haben gezeigt, daß nach Gabe von Vasopressin sowie nach Zufuhr hypertonischer Lösungen, die zu einer vermehrten Inkretion von antidiuretischem Hormon (ADH) führen (VERNEY, 1954), die Konzentration an proteingebundenen SH-Gruppen in der Niere abnimmt. Da auch nach Gabe diuretisch wirksamer Substanzen infolge der erhöhten Wasserverluste eine gesteigerte Abgabe von Vasopressin aus dem HHL beobachtet wird (GAUER und HENRY, 1963), wäre es möglich, daß die unter dem Einfluß von 6-AN auftretende Erniedrigung der GSH-Konzentration in der Niere lediglich die Folge einer vermehrten ADH-Inkretion ist.

Die Abnahme des renalen GSH-Gehalts könnte jedoch auch auf einer erhöhten Abgabe von Aldosteron aus den Nebennieren beruhen, da Verluste von Natriumionen einen Reiz zur Inkretion des Mineralcorticoids darstellen. Um auszuschließen, daß der

Zeit nach i.p. Injek- tion von 50 mg/kg 6-AN	G S H ($\mu\text{mol/g FG}$)		
	Kontrollen	6-AN	Abnahme in %
2 Std.	2,71 $\pm$ 0,13 n = 6	2,41 $\pm$ 0,19 n = 6	11
4 Std.	2,26 $\pm$ 0,08 n = 6	1,93 $\pm$ 0,18 n = 6	15
6 Std.	2,49 $\pm$ 0,11 n = 6	1,55 $\pm$ 0,05 n = 6	38
p < 0,0002			
8 Std.	2,68 $\pm$ 0,11 n = 6	1,90 $\pm$ 0,09 n = 6	29
p < 0,0004			
16 Std.	2,49 $\pm$ 0,10 n = 6	1,91 $\pm$ 0,15 n = 6	23
p = 0,01			

Tab. 1 Abnahme der GSH-Konzentration in der Niere nach Gabe von 6-AN gegenüber den in der jeweiligen Versuchsreihe gemessenen Kontrollwerten

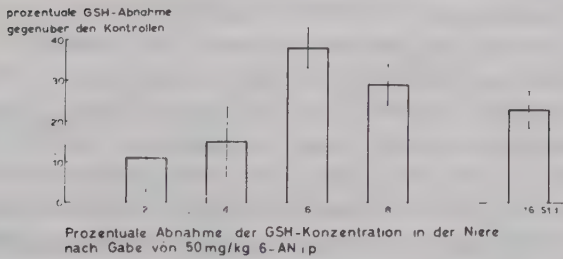
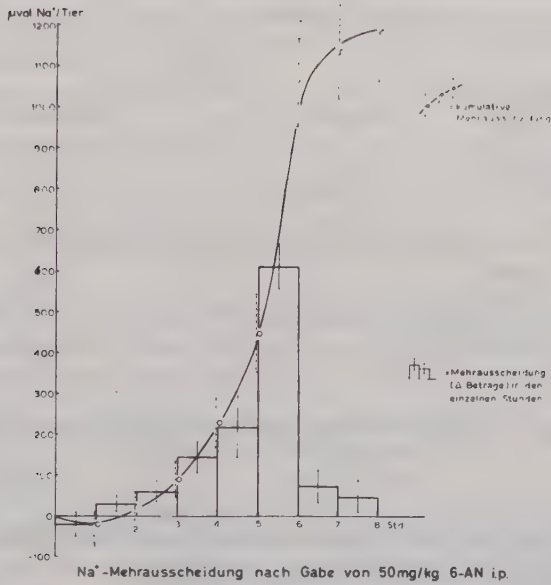


Abb. 1

Effekt des 6-AN auf den GSH-Gehalt der Nieren nicht die Folge der durch diese Substanz verursachten Na^+ -Verluste und der hierdurch bedingten hormonalen Gegenregulationen darstellt, wurde geprüft, ob Vasopressin oder Aldosteron in maximal wirk-samen Dosen eine Erniedrigung der GSH-Konzentration in der Niere hervorrufen. Weder Vasopressin noch Aldosteron bewirken jedoch eine signifikante Veränderung (Tab. 2).

Untersuchte Substanzen	G S H ($\mu\text{mol/g FG}$)	
	Kontrollen	behandelte Tiere
Vasopressin 5 mE/Tier s.c., 30 min.	2,21 + 0,06 n = 12	2,11 + 0,07 n = 12
	p > 0,25	
Aldosteron 7,5 μg /Tier i.p., 120 min. (bei ad- renalektomierten Tieren)	2,27 + 0,20 n = 6	2,30 + 0,15 n = 6
	p > 0,9	

Tab. 2 GSH-Konzentration in der Niere nach Gabe von Vasopressin und Aldosteron

III. Der Einfluß von Triamteren und Amiloridhydrochlorid auf die GSH-Konzentration der Niere

Wie 6-AN führen auch Triamteren und Amilorid zu einer Steigerung der Na^+ -Ausscheidung bei Einschränkung der renalen K^+ -Elimina-tion (HERKEN und SENFT, 1961; SENFT, 1962; BAER, 1966; BAER, JONES, SPITZNER und RUSSO, 1967). ZEMISCH (1964), sowie HERKEN, SENFT und ZEMISCH (1964) haben festgestellt, daß die renale Wirkung des Triamterens durch eine Vorbehandlung mit 6-AN ver-hindert werden kann. Andererseits wirkt auch 6-AN nicht mehr, wenn die Tiere vorher Triamteren erhalten haben (ZEMISCH, 1964; HERKEN, SENFT und ZEMISCH, 1964). Es wurde deshalb geprüft, ob die Gabe von Triamteren und Amilorid ebenfalls zu einer Erniedri-gung des GSH-Gehalts der Niere führt. Dies ist nicht der Fall, weder bei einmaliger Gabe von Amilorid oder Triamteren noch nach wiederholter Zufuhr des Pteridinderivats konnte eine signi-fikante Veränderung der GSH-Konzentration festgestellt werden

Untersuchte Substanzen	G S H ($\mu\text{mol/g FG}$)	
	Kontrollen n = 6	behandelte Tiere n = 6
Triamteren 50 min. 5 mg/kg oral	1,83 $\pm$ 0,21	1,65 $\pm$ 0,15
60 min. 6.2 mg/(Tier Std.)	2,18 $\pm$ 0,08	2,18 $\pm$ 0,08
Amilorid 1 mg/kg i.v., 60 min.	2,01 $\pm$ 0,19	2,03 0,13

Tab. 3 Veränderung der GSH-Konzentration in der Niere nach Gabe von Triamteren und Amilorid

(Tab. 3). Die Substanz hat auch auf den durch 6-AN bedingten Abfall des reduzierten Glutathions in der Niere keinen Einfluß (Tab. 4).

Untersuchte Substanzen	G S H ($\mu\text{mol/g FG}$)	
	Kontrollen n = 6	behandelte Tiere n = 6
6-AN ⁺	2,18 $\pm$ 0,08	1,60 $\pm$ 0,08
		Δ : 0,58 $\pm$ 0,11
Triamteren ⁺⁺	2,18 $\pm$ 0,08	2,18 $\pm$ 0,08
		p > 0,3
6-AN ⁺ + Triamteren ⁺⁺	2,18 $\pm$ 0,08	1,45 $\pm$ 0,08
		Δ : 0,73 $\pm$ 0,10

⁺ 50 mg/kg, i.p., 6 Std.

⁺⁺ 6.2 mg/(Tier und Std.), p.o.

Tab. 4 Fehlender Einfluß von Triamteren auf die durch 6-AN bedingte Abnahme der GSH-Konzentration in der Niere

IV. Der Einfluß von Ethacrynsäure auf die GSH-Konzentration der Niere

Ethacrynsäure ist ein Diuretikum, von dem in einer der ersten Veröffentlichungen über diese Substanz mitgeteilt wurde, daß es zwar bei Hunden und beim Menschen, nicht jedoch bei Ratten zu einer vermehrten Ausscheidung von Wasser und Na^+ -Ionen führt (SCHULZ, ORAGOE, BICKINS, BOHLHOFER und SPRAGUE, 1962). BÜNTIG, ROHDE und DEETJEN (1967), sowie SENFT und LÜBBEMEIER (1967) konnten jedoch zeigen, daß auch Ratten nach i.v. Injektion von Ethacrynsäure in einer Dosis von mindestens 20 mg/kg in vermehrtem Maß Natriumionen und Wasser ausscheiden.

Von dieser Substanz ist bekannt, daß sie mit SH-Gruppen eine chemische Bindung eingehen kann (KOMORN und CAFRUNY, 1965). Wenn ein kausaler Zusammenhang zwischen der GSH-Konzentration in der Niere und dem tubulären Na^+ -Transport bestehen sollte, so dürfte nach Gabe von Ethacrynsäure in einer Dosis, die bei Ratten noch nicht diuretisch wirkt, keine Erniedrigung des reduzierten Glutathions in diesem Organ auftreten. Diese Annahme läßt sich mit dem vorliegenden Ergebnis vereinbaren. 30 min. nach i.v. Injektion von 5 mg/kg Ethacrynsäure konnten keine Veränderungen des GSH-Gehalts in der Rattenniere festgestellt werden (Tab. 5).

Untersuchte Substanzen	G S H ($\mu\text{mol/g FG}$)	
	Kontrollen n = 6	behandelte Tiere n = 6
Ethacrynsäure 5 mg/kg i.v., 30 min.	2,14 ± 0,03	2,15 ± 0,06
p > 0,85		

Tab. 5 Veränderung der GSH-Konzentration in der Niere nach Gabe von Ethacrynsäure

V. Der Einfluß von Furosemid auf die GSH-Konzentration in der Niere

Im Anschluß hieran wurde geprüft, ob Furosemid den GSH-Gehalt der Niere beeinflußt. Von diesem Diuretikum wird angenommen, daß es ebenso wie die Ethacrynsäure (GOLDBERG, McCURDY, FOLTZ und BLUEMLE, 1964; LEDINGHAM und BAYLISS, 1965) die tubuläre Rückgewinnung von Natriumionen im aufsteigenden Ast der Henleschen Schleife einschränkt (DEETJEN, 1965, 1967; MENG, 1967). Da bereits nach Injektion von 5 mg/kg des Diuretikums eine erhebliche Na^+ -Mehrausscheidung auftritt (Abb. 2), wurden die folgenden Versuche mit dieser Dosis durchgeführt.

Im Gegensatz zur Ethacrynsäure führt Furosemid auch in Dosen unter 20 mg/kg (i.v.) bei der Ratte zu einer Mehrausscheidung von Natriumionen (Abb. 2). Die Untersuchungen ergaben, daß nach i.v. Injektion dieser Dosis die GSH-Konzentration abnimmt. Bereits 7,5 min. nach Gabe des Diuretikums war sie gegenüber unbehandelten Tieren um 13,5 % erniedrigt. Das Maximum des Effektes lag zwischen der 15. und 30. Minute. Zu diesem Zeitpunkt war der GSH-Gehalt um 21 % des bei den Kontrollen gemessenen Wertes abgesunken. Danach läßt die Wirkung des Anthranilsäurederivats nach. 2 Stunden nach der Injektion konnte kein Unterschied mehr gegenüber Tieren festgestellt werden, die das Diuretikum nicht erhalten hatten (Tab. 6).

Um auszuschließen, daß die nach Gabe des Diuretikums beobachtete Abnahme der GSH-Konzentration, die in der Dimension $\mu\text{mol/g FG}$ (FG = Feuchtgewicht) angegeben wurde, lediglich durch einen vermehrten Wassergehalt der Nieren vorgetäuscht wird, wurde das Trockengewicht (TrG) der Organe bestimmt. Die Injektion von Furosemid hat zwar eine Zunahme des Wassergehalts der Nieren zur Folge, die GSH-Konzentration ist jedoch auch in der Dimension $\mu\text{mol/g TrG}$ deutlich erniedrigt (Tab. 7).

Zeit nach i.p. Injek- tion von 50 mg/kg 6-AN	G S H (μ mol/g FG)		Abnahme in %
	Kontrollen	Furosemid	
7,5 min.	2,16 $\pm$ 0,08 n = 6	1,87 $\pm$ 0,04 n = 6	13,5
	p < 0,01		
15 min.	2,47 $\pm$ 0,10 n = 6	1,94 $\pm$ 0,06 n = 6	21,5
	p < 0,002		
30 min.	2,53 $\pm$ 0,09 n = 11	1,99 $\pm$ 0,08 n = 12	21
	p < 0,0003		
60 min.	2,56 $\pm$ 0,12 n = 6	2,28 $\pm$ 0,07 n = 6	11
120 min.	2,39 $\pm$ 0,10 n = 6	2,33 $\pm$ 0,17 n = 6	3

Tab. 6 Abnahme der GSH-Konzentration in der Niere nach Gabe von Furosemid gegenüber den in der jeweiligen Versuchsreihe gemessenen Kontrollwerten

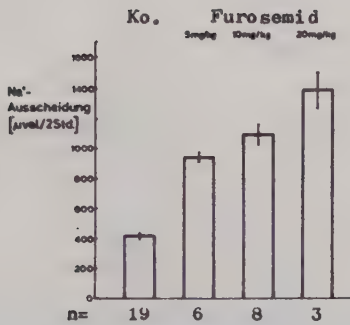


Abb.2: Na⁺-Ausscheidung im Harn nach
i.v. Injektion von Furosemid
(Ko.= Kontrollen)

Abb. 2

	Kontrollen	Furosemid 5 mg/kg i.v., 30 min.
Wassergehalt der Niere (ml/100 g FG)	77,21 ± 0,22 n = 6	79,57 ± 0,27 n = 6
	p < 0,0002	
GSH-Konzentration der Niere (µmol/g FG)	2,53 ± 0,09 n = 6	1,99 ± 0,08 n = 6
	p < 0,0003	
(µmol/g TrG)	11,09 ± 0,41 n = 6	9,73 ± 0,34 n = 6
	p < 0,025	

Tab. 7 Abnahme der GSH-Konzentration der Niere
- bezogen auf Feucht- und Trockengewicht -
nach Gabe von Furosemid

VI. Beziehungen zwischen natriumeliminierendem Effekt, Aus-
scheidung des Diuretikums und Abnahme der GSH-Konzentra-
tion der Niere nach Gabe von Furosemid

Von diesen Befunden ausgehend wurde untersucht, ob ein zeitlicher Zusammenhang zwischen der Abnahme des reduzierten Glutathions und der Stärke der Na^+ -Mehrausscheidung unter dem Einfluß von Furosemid besteht. Bei diesen Versuchen wurde außerdem die im Harn ausgeschiedene Menge des Anthranilsäurederivats bestimmt.

Der natriumeliminierende Effekt von 5 mg/kg Furosemid setzt bereits 7,5 min. nach i.v. Injektion der Substanz ein. Bis zu diesem Zeitpunkt haben die Tiere etwa 120 µval Na^+ mehr ausgeschieden als Kontrolltiere, denen nur das Lösungsmittel injiziert wurde. Das Maximum der Na^+ -Elimination wird zwischen

Na⁺-Elimination, Furosemdausscheidung und Abnahme der GSH-Konzentration in der Niere nach Gabe von 5 mg/kg Furosemid iv

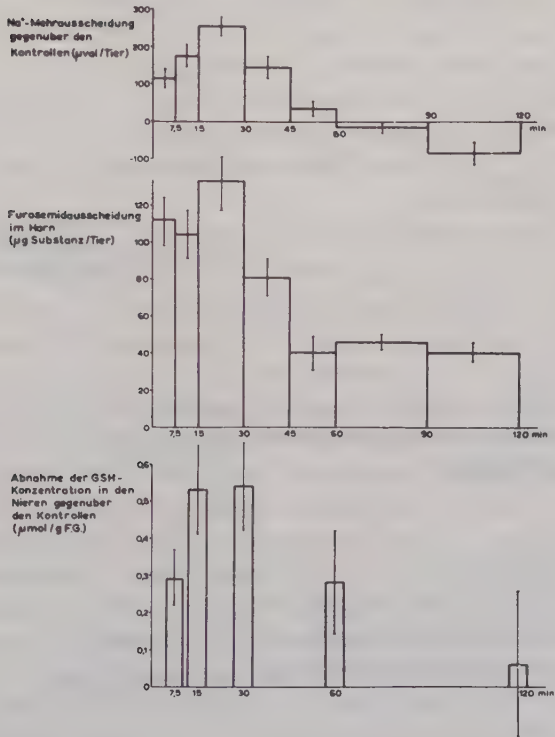


Abb. 3

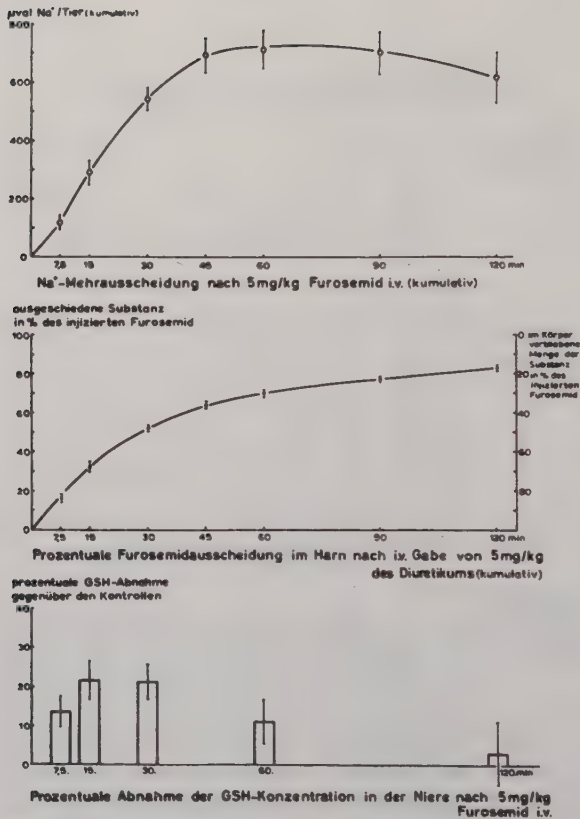


Abb. 4

der 15. und 30. Minute erreicht, zum gleichen Zeitpunkt ist auch die GSH-Konzentration am stärksten erniedrigt. Zwischen der 30. und 60. Minute nimmt der tubuläre Effekt des Diuretikums ab; zwischen der 60. und 120. Minute nach der Injektion von Furosemid scheiden die behandelten Tiere sogar weniger Na^+ aus als die Kontrollen.

Eine zeitliche Übereinstimmung zeigt sich nicht nur zwischen der natriumeliminierenden Wirkung und der Abnahme des reduzierten Glutathions in der Niere, sondern ist auch bei einem Vergleich beider Effekte mit der Höhe der Furoseמידausscheidung im Harn erkennbar. In den ersten 30 Minuten werden etwa 50 % der injizierten Dosis im Urin wiedergefunden; nach 2 Stunden sind nur noch 18 % des Diuretikums im Organismus der Tiere vorhanden (Abb. 3; Abb. 4).

VII. Der Einfluß von Furosemid auf die Aktivität der Glutathionreduktase

Zur Beantwortung der Frage, auf welche Weise die Gabe von Furosemid zu einer Erniedrigung der GSH-Konzentration in der Niere führt, wurde untersucht, ob diese Substanz ähnlich wie 6-ANADP die Aktivität der Glutathionreduktase in vitro beeinflusst. Die Ergebnisse dieser Versuche wurden nach Angaben von LINEWEAVER und BURK (1934) sowie WEBB (1963) graphisch dargestellt. Sie zeigen, daß Furosemid ein Hemmstoff dieses Ferments ist. Wie aus den Abbildungen 5 und 6 hervorgeht, handelt es sich dabei um eine Mischform zwischen kompetitiver und nicht kompetitiver Hemmung gegenüber GSSG. Bei Auftragung der reziproken Werte der Umsatzgeschwindigkeit ($\frac{1}{v}$) in Abhängigkeit von der Hemmstoffkonzentration (I) zeigt sich, daß zwischen beiden Größen keine lineare Beziehung besteht (Abb. 7). Nach WEBB (1963) sprechen derartige Kurven dafür, daß zwei oder mehr Inhibitormoleküle mit dem Enzym reagieren.

Wird bei konstanter GSSG-Konzentration der Gehalt an NADPH_2 im Inkubationsmedium variiert, so zeigt sich, daß Furosemid gegenüber dem Pyridinnukleotid als Substrat keine Hemmwirkung aufweist (Abb. 8; Abb. 9). Bei höheren Konzentrationen des Diuretikums (über $0,5 \cdot 10^{-3}$ M) nimmt allerdings die Fermentaktivität ab,

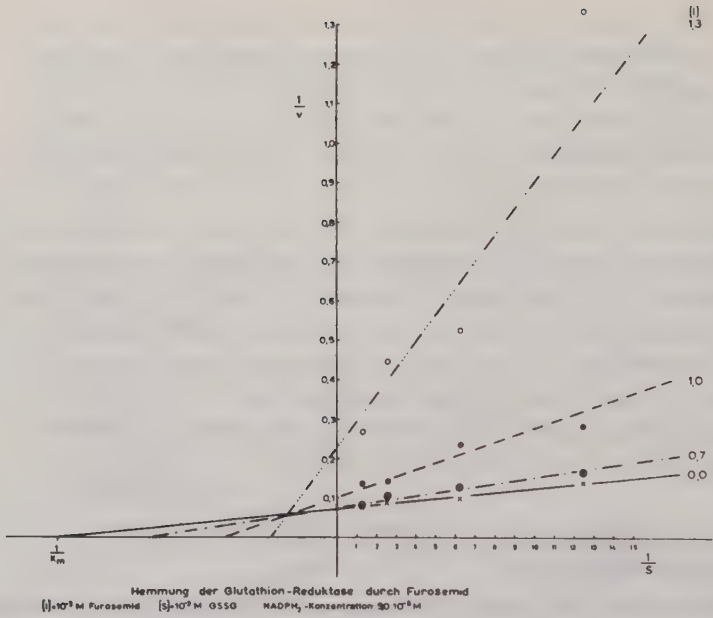


Abb. 5

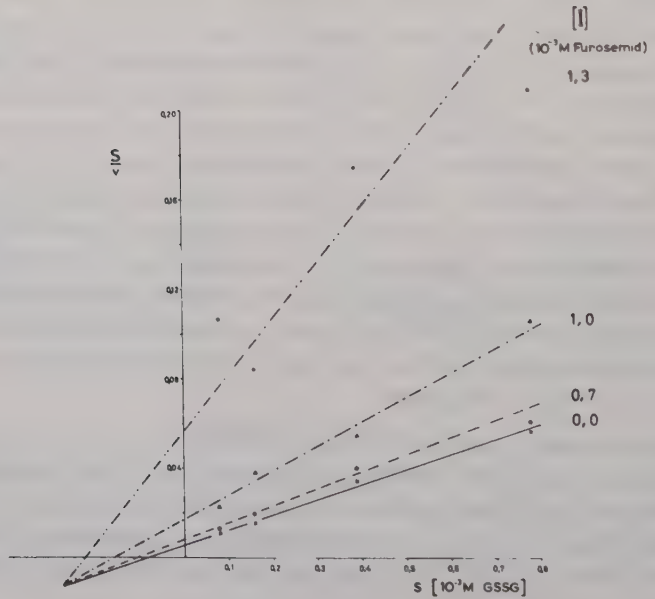


Abb. 6

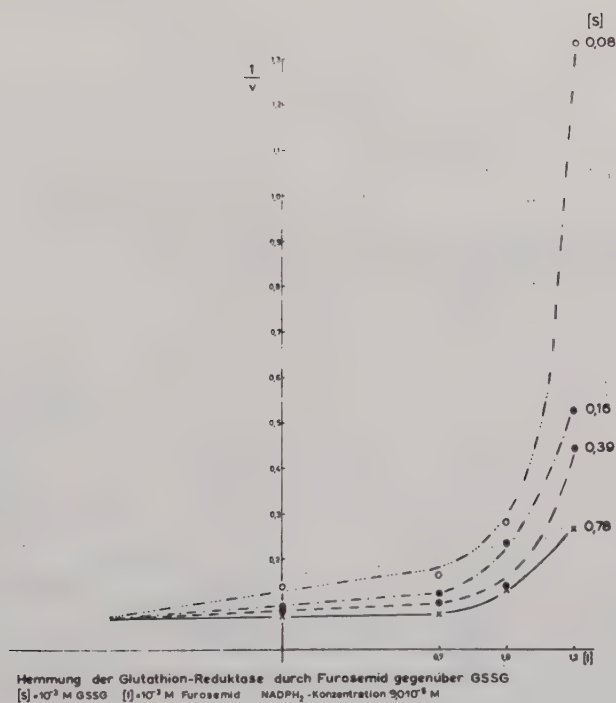


Abb. 7

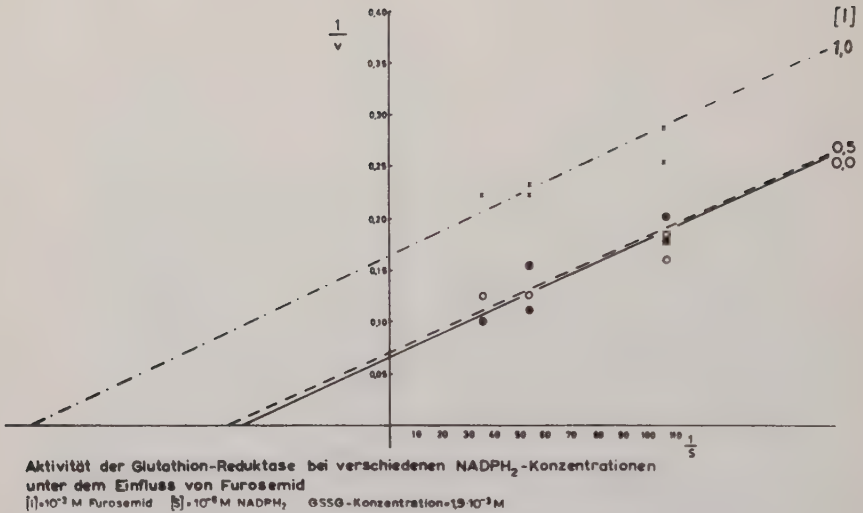


Abb. 8

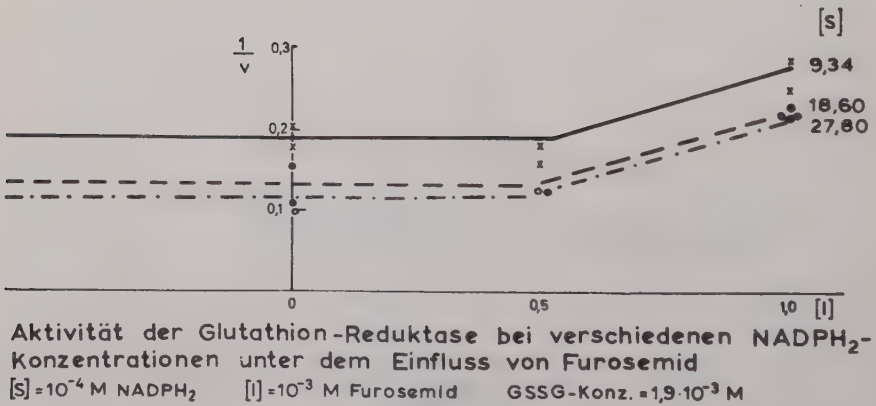


Abb. 9

da sich unter diesen Bedingungen die Hemmung gegenüber dem oxydierten Glutathion bemerkbar macht. Diese Einschränkung der enzymatischen Aktivität ist jedoch unabhängig von der NADPH_2 -Konzentration (s. Abb. 8 und 9).

VIII. Der Einfluß einer kombinierten Behandlung von 6-AN und Furosemid auf die renale Na^+ -Elimination und die Erniedrigung der GSH-Konzentration in der Niere

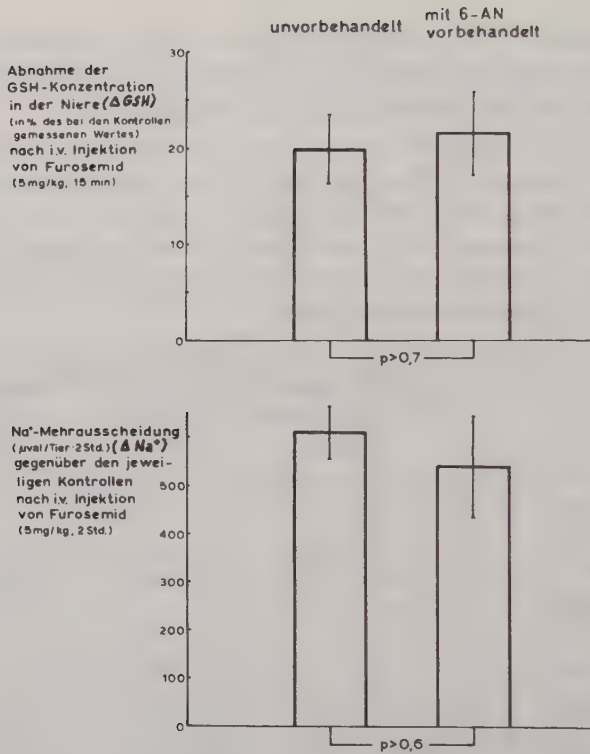
Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, daß die Aktivitätsabnahme der Glutathionreduktase unter dem Einfluß von Furosemid auf einem anderen Mechanismus beruht als er von COPER und NEUBERT (1964) für die Hemmung des Enzyms durch 6-ANADP gefunden wurde, da dieses abnorm strukturierte Pyridinnukleotid ein kompetitiver Hemmstoff gegenüber NADPH_2 ist.

	nach 6-AN	nach Furosemid	nach 6-AN + Furosemid errech- neter Wert	nach 6-AN + Furosemid geme- sener Wert
Abnahme der GSH-Konzentration in der Niere ($\mu\text{mol/g FG}$) ⁺ [Kontrollen minus behandelte Tiere]	0,84 ± 0,08 n = 30	0,48 ± 0,09 n = 24	1,32 ± 0,12	1,18 ± 0,08 n = 30
			p > 0,3	
Mehrausscheidung von Na^+ ($\mu\text{val}/(\text{Tier} \cdot 2 \text{ Std.})$) ⁺⁺ [behandelte Tiere minus Kontrollen]	364,2 ± 82 n = 59	609,2 ± 52 n = 26	973,4 ± 97	912,0 ± 84 n = 29
			p > 0,7	

⁺6-AN: 50 mg/kg, i.p., 6 Std.
Furosemid: 5 mg/kg, i.v., 15 min.

⁺⁺6-AN: 50 mg/kg i.p., 4. + 5. Std.
Furosemid: 5 mg/kg, i.v., 120 min
(4. + 5. Std. nach Beginn des Infusionsversuchs)

Tab. 8 Additiver Effekt von 6-AN und Furosemid auf die Abnahme der GSH-Konzentration in der Niere und die Ausscheidung von Natriumionen.



Na^+ -Mehrausscheidung (ΔNa^+) und renale GSH-Abnahme (ΔGSH) unter dem Einfluß von Furosemid bei unvorbehandelten Tieren und Ratten, die mit 6-AN (50 mg/kg, 5 Std.) vorbehandelt wurden.

Abb. 10

Aufgrund dieser Befunde wäre zu erwarten, daß sich die nach Gabe von 6-AN oder Furosemid beobachteten Erniedrigungen der GSH-Konzentration in der Niere bei gleichzeitiger Injektion der Verbindungen addieren. Diese Annahme konnte bestätigt werden. Der Einfluß beider Substanzen auf die Na^+ -Mehrausscheidung ist ebenfalls additiv.

Die gemessenen Werte entsprachen in beiden Fällen der Summe der Einzeleffekte, die nach alleiniger Gabe von 6-AN oder Furosemid auftraten (Tab. 8).

Diese Untersuchungen ergaben zugleich, daß eine Vorbehandlung mit 6-AN keinen Einfluß auf die Na^+ -Mehrausscheidung und die Abnahme des reduzierten Glutathions unter der Wirkung des Anthranilsäurederivats hat (Abb. 10).

IX. Die Einschränkung der natriumeliminierenden Wirkung von Furosemid durch Injektion von GSH

Abschließend wurde untersucht, ob die nach Gabe von Furosemid auftretende Hemmung der tubulären Rückgewinnung von Natriumionen durch Vorbehandlung der Tiere mit GSH verhindert oder zumindest verringert werden kann. Zu diesem Zweck erhielten die Versuchstiere vor Gabe des Diuretikums eine i.v. Injektion von 500 mg/kg GSH. Bei dieser Vorbehandlung mit reduziertem Glutathion war der natriumeliminierende Effekt von 5 mg/kg Furosemid erheblich geringer als bei Tieren, die nur das Diuretikum erhalten hatten. Die Na^+ -Mehrausscheidung nahm von 915 auf 510 $\mu\text{val/Tier}$ innerhalb der ersten 60 min. nach Beginn des Versuches ab (Abb. 11).

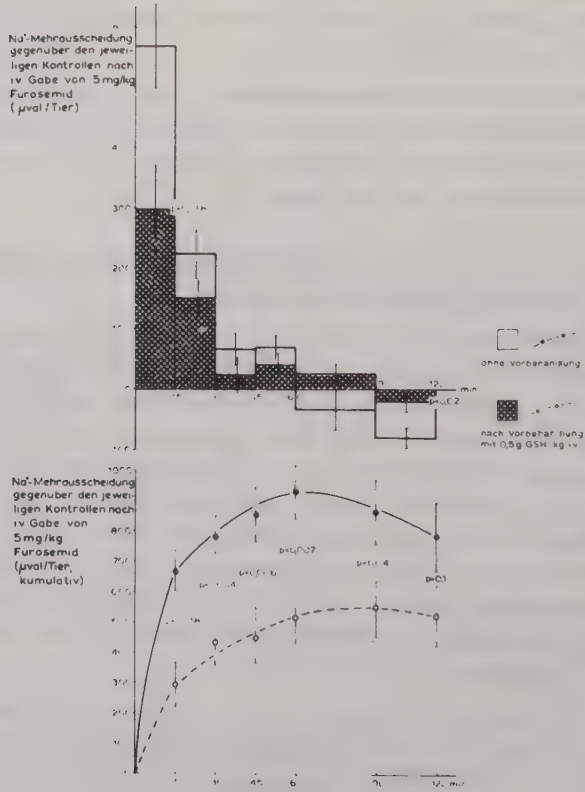


Abb. 11

Diskussion

Die Abnahme des GSH-Gehalts in der Niere nach Gabe von 6-AN zeigt, daß 6-ANADP nicht nur in vitro (COPER und NEUBERT, 1964), sondern auch in vivo zu einer Hemmung der enzymatischen Wasserstoffübertragung führt. Als Ursache hierfür kann eine Hemmung der Glutathionreduktase infolge der Biosynthese des abnorm strukturierten Pyridinnukleotids angenommen werden. Aus Untersuchungen über den Einfluß von 6-ANADP auf die Kinetik der Glucose-6-phosphat-dehydrogenase, einer anderen NADP-abhängigen Oxydoreduktase, ist bekannt, daß 6-ANADP eine kompetitive Hemmwirkung gegenüber dem natürlichen Pyridinnukleotid ausübt (COPER und NEUBERT, 1964).

Die zeitliche Übereinstimmung im Ausmaß der Erniedrigung des renalen GSH-Gehalts und der Mehrausscheidung von Natriumionen unter dem Einfluß von 6-AN weist zugleich darauf hin, daß zwischen tubulärer Na^+ -Resorption und Wasserstoffübertragung ein Zusammenhang besteht.

Aufgrund der mit 6-AN durchgeführten Untersuchungen läßt sich allerdings nicht entscheiden, ob für die Störung im Na^+ -Transport die Abnahme der renalen GSH-Konzentration verantwortlich ist, oder ob diese lediglich Ausdruck einer allgemeinen Störung der Wasserstoffübertragung ist. Da andere NAD- und NADP-bedürftige Oxydoreduktasen ebenfalls durch die entsprechenden 6-AN enthaltenden Analoga gehemmt werden (COPER und NEUBERT, 1964), könnten auch diese enzymatischen Umsetzungen oder die hierbei auftretenden Substratveränderungen für den tubulären Na^+ -Transport von Bedeutung sein. Folgende Befunde sprechen jedoch dafür, daß eine direkte Beziehung zwischen renalem GSH-Gehalt und der tubulären Rückgewinnung von Natriumionen besteht:

1. Die Injektion von Furosemid führt auch zu einer Steigerung der Na^+ -Ausscheidung, die von einer Erniedrigung des GSH-Gehalts der Niere begleitet ist. Das Anthranilsäurederivat ist ebenfalls ein Hemmstoff der Glutathionreduktase. Diese Hemmung erfolgt im Gegensatz zu der durch 6-ANADP verursachten Einschränkung der enzymatischen Aktivität nicht durch Verdrängung des Wasserstoffdonators (NADPH_2) vom Rezeptor

am Enzymmolekül. In beiden Fällen ist die Bildung von reduziertem Glutathion vermindert.

2. Da 6-ANADP und Furosemid die Umsatzgeschwindigkeit der Glutathionreduktase auf verschiedene Weise erniedrigen, ist es erklärlich, daß nach Injektion von 6-AN und dem Diuretikum eine Abnahme der renalen GSH-Konzentration auftritt, die der Summe beider Einzeleffekte entspricht. Die Na^+ -Mehrausscheidung nach Gabe von Furosemid und dem Antimetaboliten war ebenfalls additiv.
3. Der Na^+ -eliminierende Effekt von Furosemid wird durch Vorbehandlung mit GSH fast auf die Hälfte vermindert.
4. AVIRAM, SCHALITT, KASSEM und GROEN (1966) fanden bei ihren Untersuchungen an der isolierten Rinderlinse, daß eine Abnahme des GSH-Gehalts mit einer Störung des Na^+ - und K^+ -Transports einhergeht, die sich in einem Anstieg der Na^+ -Konzentration und einer Erniedrigung des K^+ -Gehalts in diesem Gewebe äußert.
5. Über ähnliche Untersuchungen, die an Erythrozyten durchgeführt wurden, haben vor kurzer Zeit SUTHERLAND, ROTHSTEIN und WEED (1967) berichtet. Sie konnten zeigen, daß eine Abnahme reaktionsfähiger SH-Gruppen in der Erythrozytenmembran von einer gesteigerten Kationenpermeabilität begleitet ist, die zu einer Abnahme des zellulären K^+ -Gehalts und einer Aufnahme von Na^+ -Ionen aus dem Inkubationsmedium führt.

Auf welche Weise GSH den aktiven Kationen-Transport beeinflusst, kann aufgrund des gegenwärtigen Standes der Kenntnisse noch nicht entschieden werden. Folgende GSH-abhängige Reaktionen können in Erwägung gezogen werden: Eine wesentliche Bedeutung des Glutathions für den Stoffwechsel ist darin zu sehen, daß es an der Aufrechterhaltung des Quotienten zwischen Sulfhydryl- und Disulfidgruppen ($\frac{-\text{SH}}{-\text{S-S-}}$) beteiligt ist (LUMPER und ZAHN, 1965). Hierdurch ist es möglich, daß SH-Gruppen enthaltende Enzyme, die durch Oxydation ihre Aktivität verlieren, über einen Disulfidaustausch mit GSH wieder reaktiviert werden (RAPOPORT, 1964). Eine Erniedrigung des $\frac{-\text{SH}}{-\text{S-S-}}$ -Quotienten kann jedoch auch direkt zu einer Hemmung enzymatischer Aktivi-

täten führen. DICK, DICK, ZINN und TOSTESON (1967) konnten zeigen, daß die durch Na^+ - und K^+ -stimulierbare Membran-ATPase von Hammelerythrozyten durch Disulfide wie Cystin und GSSG unter Bildung eines gemischten Enzymproteinindisulfids nach folgender Reaktion gehemmt wird:



Hierdurch könnte der aktive Transport von Na^+ und K^+ durch die Erythrozytenmembran gestört werden.

Über ein Enzymsystem, das mit Hilfe von GSH Peroxyde abbaut, ist das Tripeptid außerdem an der Aufrechterhaltung der normalen Zellstruktur beteiligt (MILLS, 1957). In den Erythrozyten wurde eine Glutathionperoxydase (glutathione: H_2O_2 -oxidoreductase) nachgewiesen (SCHNEIDER und FLOHE, 1967), die H_2O_2 unter Oxydation von GSH zu H_2O reduziert. Eine Abnahme der GSH-Konzentration in den Erythrozyten, wie sie durch einen Mangel an NADPH_2 hervorgerufen werden kann, führte nach den Untersuchungen von JACOB und JANDL (1967) unter dem Einfluß von H_2O_2 zu einer beschleunigten Oxydation von Hämoglobin zu Methämoglobin.

Außerdem ist GSH das Coenzym der Glyoxalase I⁺, der Triosephosphatdehydrogenase⁺⁺ sowie der Formaldehyddehydrogenase⁺⁺⁺, einem Enzym, das Formaldehyd zu Ameisensäure oxydiert (RACKER, 1951; RACKER und KRIMSKY, 1952; HOLZER und HOLZER, 1952; STRITTMATTER und BALL, 1955).

Eine Beteiligung des Glutathions am Elektronentransport wurde bei Pflanzen in einem Nebenweg der Atmungskette gefunden (MAPSON, 1961; VILTER, 1964). Ob dieser Stoffwechselweg im tierischen Organismus existiert, ist nicht bekannt.

⁺ (S-lactoyl-glutathione methylglyoxal-lyase (isomerizing) ED 4.4.1.5.)

⁺⁺ (D-glyceraldehyde-3phosphate:NAD oxidoreductase (phosphorylating) EC 1.2.1.12.)

⁺⁺⁺ (formaldehyde:NAD oxidoreductase EC 1.2.1.1.)

Zusammenfassung

Die Applikation von 6-Aminonikotinsäureamid (6-AN) bewirkt eine Anzahl von Stoffwechselstörungen, zu denen u.a. eine vermehrte renale Elimination von Na^+ gehört.

6-AN wird im Organismus in die natürlichen Pyridinnukleotide unter Bildung von 6-ANAD und 6ANADP eingebaut. Diese abnorm strukturierten Pyridinnukleotide sind nicht in der Lage, als Wasserstoffacceptor zu fungieren und hemmen außerdem die Funktion des noch vorhandenen $\text{NAD}(\text{H}_2)$ bzw. $\text{NADP}(\text{H}_2)$, als Cofermente von Oxydoreduktasen zu wirken. Da sich dieser Effekt in vitro besonders deutlich am Beispiel der Glutathionreduktase zeigen läßt, wurde untersucht, ob die Gabe von 6-AN zu einer Abnahme der renalen GSH-Konzentration führt und ob eine zeitliche Übereinstimmung zwischen einem derartigen Effekt und der durch 6-AN bedingten Hemmung des tubulären Na^+ -Transports erkennbar ist.

Infiziert man Ratten 50 mg/kg 6-AN, so nimmt die GSH-Konzentration in der Niere ab. Das Maximum der nach Gabe des Antimetaboliten beobachteten Na^+ -Mehrausscheidung tritt zum gleichen Zeitpunkt auf, in dem der renale GSH-Gehalt am stärksten erniedrigt ist. Der Rückgang der tubulären Störung ist von einem Wiederanstieg des reduzierten Glutathions begleitet.

Dieser Befund gab zu der Überlegung Anlaß, ob möglicherweise ein kausaler Zusammenhang zwischen tubulärem Na^+ -Transport und renalem GSH-Gehalt besteht. Auf eine derartige Beziehung wurde von AVIRAM, SCHALITT, KASSEM und GROEN (1966) hingewiesen. Diese Autoren konnten bei Untersuchungen an der isolierten Rinderlinse zeigen, daß eine Abnahme der GSH-Konzentration in diesem Gewebe von einer Störung des Kationentransports begleitet ist. Es wurde deshalb geprüft, ob auch andere Substanzen, die den tubulären Na^+ -Transport behindern, zu einer Abnahme des renalen GSH-Gehalts führen.

Die Untersuchungen ergaben, daß die nach i.v. Injektion von 5 mg/kg Furosemid auftretende Na^+ -Mehrausscheidung ebenfalls von einer Erniedrigung der GSH-Konzentration in der Niere begleitet ist. Die Maxima beider Effekte liegen zwischen der 15.

und 30. Minute nach Gabe des Diuretikums. Als Ursache für die Abnahme des reduzierten Glutathions unter dem Einfluß von Furosemid kann eine Einschränkung der Glutathionreduktaseaktivität durch das Anthranilsäurederivat angesehen werden. Die in vitro durchgeführten Versuche ergaben, daß es sich hierbei um eine Mischform zwischen nicht kompetitiver und kompetitiver Hemmung gegenüber oxydiertem Glutathion (GSSG) als Substrat handelt.

Da das Diuretikum und 6-ANADP die Umsatzgeschwindigkeit der Glutathionreduktase auf verschiedene Weise herabsetzen, ist es erklärlich, daß die Effekte von 6-AN und Furosemid auf den renalen GSH-Gehalt additiv sind. Das gleiche gilt für die Na^+ -eliminierende Wirkung beider Substanzen.

Ein weiterer Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen renalem GSH-Gehalt und tubulärem Na^+ -Transport ist darin zu sehen, daß nach vorheriger i.v. Injektion von 0,5 g/kg GSH die unter dem Einfluß von Furosemid auftretende Na^+ -Mehrausscheidung fast auf die Hälfte reduziert wird.

Literaturverzeichnis

- AVIRAM, A., M. SCHALITT, N. KASSEM and J.J. GROEN
Glucose utilization, glutathione, potassium and sodium
content of the isolated bovine lens
Clin. Chim. Acta 14, 442 (1966)
- BAER, J.A.
Pharmacology of diuretics
In: Renal and Diuretic Symposium, Rotterdam, Oct., 15. 1966
(in press)
- BAER, J.A., C.B. JONES, S.A. SPITZER and H.F. RUSSO
The potassium-sparing and natriuretic activity of N-amidino-
3,5-diamino-6-chloropyrazinecarboxamide hydrochloride dihy-
drate (amiloride hydrochloride)
J. Pharmacol. Exp. Ther. 157, 472 (1967)
- BERGMEIER, H.U.
Methoden der enzymatischen Analyse
Verlag Chemie GmbH, Weinheim/B., S. 363, 283 (1962)
- BRUNNEMANN, A., COPER, H. und NEUBERT, D.
Biosynthese und Wirkung des 6-Aminonicotinamid-adenindinu-
cleotids (6-ANAD)
Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmacol. 246, 437 (1964)
- BÜNTIG, W.E., ROHDE, R. und P. DEETJEN
Über die Wirkung von Ethacrynsäure im Rattenexperiment
Vortrag auf dem V. Symposium der Gesellschaft für Nephro-
logie, Lausanne, 21. Sept. 1967 (im Druck)
- COPER, H. und H. HERKEN
Schädigung des Zentralnervensystems durch Antimetaboliten
des Nikotinsäureamids
Dtsch. med. Wschr. 88, 2025 (1963)
- COPER, H., H. HERKEN und D. NEUBERT
Einfluß von NADP-Analogen auf die Reaktionsgeschwindigkeit
einiger NADP-bedürftiger Oxydoreductasen
Biochim. Biophys. Acta 89, 23 (1964)
- DEETJEN, P.
Mikropunktionsuntersuchungen zur Wirkung von Furosemid
Pflügers Arch. Ges. Physiol. 284, 184 (1965)
- DEETJEN, P.
Micropuncture studies on site and mode of diuretic action
of furosemide
Ann. N.Y. Acad. Sci. 139, 408 (1967)
- DICK, D.A.T., E. DICK, M. ZINN and D.C. TOSTESON
Reversible inhibition of sheep red cell membrane-ATPase
by disulfides
Fed. Proc. 26, 545 (1967)

- DIETRICH, L.S., I.M. FRIEDLAND and L.A. KAPLAN
Pyridine nucleotide metabolism. Mechanism of
action of the niacin antagonist 6-aminonicotinamide
J. Biol. Chem. 233, 964 (1958)
- FARAH, A.
The effect of salt administration on the renal protein-
bound sulfhydryl concentration in the rat
Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmacol. 248, 1 (1964)
- GAUER, O.H. and J.P. HENRY
Circulatory basis of fluid volume control
Physiol. Rev. 43, 423 (1963)
- GOLDBERG, M., D.K. McCURDY, E.L. FOLTZ and L.W. BLUEMLE Jr.
Effect of ethacrynic acid (a new saluretic agent) on renal
diluting and concentration mechanisms: Evidence for site
of action in the loop of Henle
J. Clin. Invest. 43, 201 (1964)
- HAJDU, P. und A. HÄUSLER
Untersuchungen mit dem Salidiureticum 4-Chlor-N-(2-furyl-
methyl)-5-sulfamyl-anthranilsäure
Arzneimittelforsch. 6, 709 (1964)
- HERKEN, H. und V. NEUHOF
Spektrofluorometrische Bestimmung des Einbaus von 6-AN in
die oxydierten Pyridinnukleotide der Niere
Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmacol. 247, 187 (1964)
- HERKEN, H. und G. SENFT
2,4,7-Triamino-6-phenyl-pteridin als "Aldosteronantagonist"
Klin. Wschr. 39, 1205 (1961)
- HERKEN, H., G. SENFT und B. ZEMISCH
Die Einschränkung des tubulären Natrium- und Kaliumtrans-
portes durch Biosynthese 6-Aminonicotinsäureamid enthalten-
der Nucleotide
Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmacol. 249, 54 (1964)
- HOLZER, H. und E. HOLZER
Zum Reaktionsmechanismus der Triosephosphatdehydrierung
Hoppe-Seyler's Zschr. physiol. Chem. 291, 67 (1952)
- JACOB, H.S. and J.H. JANDL
Effects of sulfhydryl inhibition on red blood cells.
III. Glutathione in the regulation of the hexose monophosphate
pathway
J. Biol. Chem. 241, 4243 (1966)
- JOHNSON, W.J. and J.D. McCOLL
6-AN a potent nicotinamide antagonist
Science 122, 834 (1955)
- KOMORN, R. and E.J. CAFRUNY
Effects of ethacrynic acid on renal protein-bound
sulfhydryl groups
J. Pharmacol. Exp. Ther. 148, 367 (1965)

- LEDINGHAM, J.G.G. and R.J.S. BAYLISS
Metabolic effects and site of action ethacrynic acid
Clin. Pharmacol. Ther. 6, 474 (1965)
- LINEWEAVER, H. and D. BURK
The deformation of enzyme dissociation constants
J. Amer. Chem. Soc. 56, 658 (1934)
- LUMPER, L. und H. ZAHN
Chemie und Biochemie des Disulfidaustausches
Advances in Enzymology 27, 218 (1965)
- MAPSON, L.W.: Acad. Sci. 92, 21 (1961) zitiert nach:
E. STAUNTON WEST, W.R. TODD, H.S. MASON and J.T. VAN BRUGGEN
Textbook of Biochemistry, fourth Ed., The Macmillan Comp.,
N. York 1966, S. 827
- MENG, K.
Mikropunktionsuntersuchungen über die saluretische Wirkung
von Hydrochlorothiacid, Acetazolamid und Furosemid
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. exp. Path. 257, 355
(1967)
- MILLS, G.C.
I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which
protects hemoglobin from oxidative breakdown
J. Biol. Chem. 229, 189 (1957)
- MOLINA, G., A. FARAH and R. KRUSE
Effects of vasopressin and dehydration on protein-bound
sulfhydryl and disulfide groups in renal cells
Amer. J. Physiol. 204, 541 (1963)
- PÄTAU, K.
Zur statistischen Beurteilung von Messungsreihen (Eine
t-Tafel)
Biol. Zbl. 63, 154 (1943)
- RACKER, E.
The mechanism of action of glyoxalase
J. Biol. Chem. 190, 685 (1951)
- RACKER, E. and J. KRIMSKY
The mechanism of oxydation of aldehydes by glyceraldehyde-
3-phosphate dehydrogenase
J. Biol. Chem. 198, 713 (1952)
- RAPOPORT, S.M.
Medizinische Biochemie, 2. Auflage, VEB Verlag Volk und
Gesundheit, Berlin 1964, S. 108
- SCHNEIDER, F. und L. FLOHE
Untersuchungen über die Glutathion-H₂O₂-Oxydoreduktase
(Glutathionperoxydase)
Hoppe Seyler's Zschr. physiol. Chem. 348, 540 (1967)

- SCHULTZ, E.M., E.J. ORAGOE, J.B. BICKINS, W.A. BOHLHOFER
and I.M. SPRAGUE
 α , β -unsaturated ketone derivatives of aryloxyacetic acids,
a new class of diuretics
J. Med. Pharmaceut. Chem. 5, 660 (1962)
- SENF, G.
Über den Mechanismus und die Lokalisation der renalen
Wirkung von 2,4,7-Triamino-6-phenylpteridin
Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmac. 243, 352
(1962)
- SENF, G., W. LOSERT, R. SITT, J. McEVOY und H. KAESS
Vergleichende Untersuchungen über den Einfluß von 6-Amino-
nicotinamid und 2,4-Dinitrophenol auf den Natrium- und
Kaliumtransport verschiedener Gewebe
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmac. exp. Path. 255, 388
(1966)
- SENF, G. und A. LÜBBEMEIER
in Vorbereitung (1967)
- SOUTHERLAND, R.M., ROTHSTEIN, A. and R.J. WEDD
Erythrocyte membrane sulphydryl groups and cation
permeability
J. Cell. Physiol. 69, 185 (1967)
- STRITTMATER, P. and E.G. BALL
Formaldehyde dehydrogenase, a glutathione-dependent enzyme
system
J. Biol. Chem. 213, 445 (1955)
- VERNEY, E.B.
Water diuresis
Irish J. Med. Sc. 345, 377 (1954)
- VILTER, R.W.
Modern nutrition in health and disease, ed. by WOHL and
GOODHART, Lea & Febiger, Philadelphia, 1964, p. 433
zitiert nach: E. STAUNTON WEST et al.: Textbook of Bio-
chemistry, fourth Ed., The Macmillan Comp., N. York, 1966,
S.827
- WEBB, J.L.
Enzyme and metabolic inhibitors
Vol. I General principles of inhibition
Acad. Press, New York and London 1963, p. 174
- ZEMISCH, B.
Störungen des Elektrolyt- und Wasserhaushalts nach Bildung
abnorm strukturierter NAD- bzw. NADP-Analoga
Inauguraldissertation, Med. Fak. der F.U. Berlin 1964

Herrn Professor Dr. med. H. Herken danke ich für die freundliche Überlassung des Themas der vorliegenden Dissertation und für seine wissenschaftlichen Anregungen.

Mit Erschütterung traf mich nach Beendigung dieser Arbeit die Nachricht, daß mein Lehrer, Herr Professor Dr. med. G. Senft, dem ich zahlreiche Ratschläge und wertvolle Hilfe bei der Durchführung der Arbeit verdanke, am 31. 10. 1967 plötzlich gestorben ist.

Ich neige mich vor dem Manne, der mir ein kameradschaftlicher und stets aufgeschlossener Vorgesetzter war.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. med. W. Losert für seine bereitwillige Anleitung bei der Ausführung der Versuche und für viele lehrreiche Diskussionen.

Lebenslauf

Am 12. Mai 1938 wurde ich als Sohn des Apothekers Alfred Zesch in Leipzig geboren.

Im September 1944 wurde ich in Markkleeberg-West bei Leipzig eingeschult. Im Oktober 1951 verzogen wir nach Potsdam-Babelsberg. Hier beendete ich 1952 die Grundschulzeit. Bis 1954 besuchte ich die Helmholtz-Oberschule in Potsdam. Vom September 1954 bis zum Bestehen der Reifeprüfung im März 1958 war ich Schüler der Robert-Blum-Schule in Berlin-Schöneberg.

Nach zweijährigem Praktikum bestand ich im März 1960 in Berlin das pharmazeutische Vorexamen.

Im Mai 1960 begann ich mit dem Studium der Medizin und Pharmazie an der Freien Universität in Berlin. Vom Herbst 1962 bis zum Sommer 1963 studierte ich in Freiburg und Kiel an der Medizinischen Fakultät. Das pharmazeutische Staatsexamen bestand ich im Frühjahr 1965. Im Herbst 1966 legte ich in Berlin das medizinische Staatsexamen ab.

Vom November 1966 bis Ende August 1967 war ich als Medizinalassistent im Pharmakologischen Institut der Freien Universität Berlin beschäftigt. Hier fertigte ich auch die vorliegende Dissertation an. Seit Oktober 1967 arbeite ich als Medizinalassistent zur weiteren Ausbildung in der I. Medizinischen Klinik der Freien Universität Berlin.

